

#2
CT/KR 03/01323

RO/KR 08.08.2003

REC'D 20 AUG 2003

WIPO PCT

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

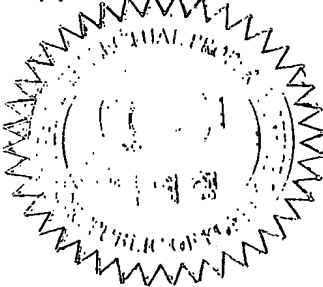
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0069178
Application Number

출원년월일 : 2002년 11월 08일
Date of Application NOV 08, 2002

출원인 : 아이진 주식회사
Applicant(s) EYEGENE INC.

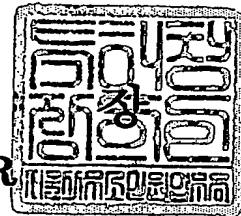
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 07 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.11.08
【발명의 명칭】	BMP -7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터 형성 억제제
【발명의 영문명칭】	Composition for preventing the formation of new scar comprising BMP-7
【출원인】	
【명칭】	아이진 주식회사
【출원인코드】	1-2000-039131-4
【대리인】	
【성명】	이후동
【대리인코드】	9-1998-000649-0
【포괄위임등록번호】	2000-047348-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조양제
【성명의 영문표기】	CHO, Yang Je
【주민등록번호】	680503-1051813
【우편번호】	140-070
【주소】	서울특별시 용산구 도원동 삼성래미안아파트 106동 204호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이인식
【성명의 영문표기】	LEE, In Sik
【주민등록번호】	651011-1047611
【우편번호】	130-792
【주소】	서울특별시 동대문구 회기동 신현대아파트 1동 1101호 (명동밝은세상 안과)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장명진
【성명의 영문표기】	JANG, Myung Jin
【주민등록번호】	770126-2057957

【우편번호】	153-832
【주소】	서울특별시 금천구 독산2동 1067번지 4/7
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	허정현
【성명의 영문표기】	HUR, Jung Hyun
【주민등록번호】	800227-2121317
【우편번호】	461-805
【주소】	경기도 성남시 수정구 수진1동 2556번지 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	안보영
【성명의 영문표기】	AHN, Bo Young
【주민등록번호】	720101-2036421
【우편번호】	120-132
【주소】	서울특별시 서대문구 북가좌2동 80-135 8/2
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유원일
【성명의 영문표기】	Y00, Won I I
【주민등록번호】	630613-1002514
【우편번호】	463-020
【주소】	경기도 성남시 분당구 수내동 36 양지마을 212-1005호
【국적】	KR
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	1
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 동 (인) 이후
【수수료】	
【기본출원료】	18 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원

1020020069178

출력 일자: 2003/7/5

【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	29,000		원	
【감면사유】	소기업 (70%감면)			
【감면후 수수료】	8,700		원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통			

【요약서】

【요약】

본 발명은 BMP(본 모포제닉프로테인)-7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터조직 형성을 억제제에 대한 발명으로 더욱 상세하게는 BMP-7 폴리펩타이드를 포함하는 마이오피브로브라스트 형성 억제제에 대한 발명이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

BMP-7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터 형성 억제제{Composition for preventing the formation of new scar comprising BMP-7}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 TGF- β 1 에 의한 마이오피브로브라스트 형성이 BMP 7 (200 ng/ml) 처리시 억제되는 것을 웨스턴 블롯을 통하여 확인시켜주는 사진. 레인 1은 TGF- β 1과 BMP처리하지 않은 것, 레인2는 TGF- β 1만 처리한 것, 레인 3은 BMP7만 처리한 것, 레인 4는 TGF- β 1과 BMP 모두 처리한 것이다.

도 2는 분자량 10만이상(레인 1), 1만 - 10만(레인 2), 1만 이하(레인 3) 3종의 샘플을 SDS-PAGE 결과 사진.

도 3a는 양막 추출물의 2-D gel 전기영동 사진이고, b는 염색한 2-D spot의 MALDI-TOF 결과 그림.

도 4는 추출액의 단백질이 BMP-7임을 웨스턴 면역블롯팅 확인한 결과 사진.

레인 1은 재조합 BMP-7 (R&D system), 레인 2는 양막 추출액 (SDS-PAGE), 레인 3은 재조합 BMP-7 웨스턴 블롯, 레인 4는 양막추출액 웨스턴 블롯이다.

도 5는 TGF- β 1 에 의한 마이오피브로브라스트 형성이 BMP 7 (200 ng/ml) 처리시 억제되는 것을 PCR을 통하여 확인시켜주는 사진. 레인1은 TGF- β 1, 레인 2는 TGF- β 1 + BMP 7 처리한 것이다.

도 6은 rat의 눈에 알칼리 화상을 주고 BMP-7을 처리하여 흉터 형성이 억제되었음을 보여주는 사진. a는 알칼리+BMP-7, b는 알칼리 처리, c는 정상 사진을 나타낸다.

도 7는 BMP-7이 inflammation을 억제함을 TNF- α 분비로 확인한 그림.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <9> 본 발명은 Bone Morphogenic Protein(이하, 'BMP'라 함)-7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터 형성 억제제에 대한 발명으로, 더욱 상세하게는 BMP-7 폴리펩타이드를 포함하는 마이오피브로브라스트 형성 억제제에 대한 발명이다.
- <10> Tseng 등은 흉터를 제거하는 과정에 있어 양막이 효과적이라는 보고하였다(J Cell Physiol. 1999 Jun;179(3):325-35, IOVS 1998;39:S428).
- <11> 또 흉터 제거에 양막의 성분이 흉터 발생을 억제하고 상처를 치료한다는 보고가 있다(Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst 1990 Spring;50(1):27-34).
- <12> 태반의 가장 안쪽층에서 태아를 둘러싸고 있는 양막은 융모막으로부터 쉽게 분리되는 약 70 μ m 두께의 얇은 반투명 막으로, 혈관이 없고 면역학적으로 불활성 조직이므로 이식을 하여도 거부반응이 없는 조직이다. 조직학적으로 양막의 구조는 단순 입방 세포로 배열된 단층의 양막세포, 두꺼운 기저막과 무혈관성인 세포외 기질로 구성되어 있으며, 기저막에는 type IV 콜라겐, laminin α 5와 β 1의 성분들을 포함한다. 양막은 염증세포를 흡착하고 염증세포의 apoptosis를 유발시켜 염증세포가 창상조직에 침투하지 못하도록 하는 항 염증작용과 기저막으로 작용함으로써 창

상 치유시 상피재생을 촉진한다. 또 양막은 EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor) 및 염증 사이토카인인 interleukin과 prostaglandin의 분비를 조절하여 항염증 작용을 나타내고, 그 외에도 TGF- β (transforming growth factor- β) 전달체계의 하향조절에 의해 fibroblast의 증식 및 마이오피브로브라스트로의 분화를 억제시키므로 항 유착작용과 함께 항반흔 작용을 나타낸다고 알려져 있고, 1940년 Davis에 의해 임상적으로 피부이식에 첫 사용되었다.

<13> Goodrich의 2000년 보고에 의하면 찢어진 피부에 양막을 덧 붙여 상처를 치유할 시에는 양막을 붙이지 않은 상처보다 1.5배 회복 속도가 증가하고, Gris의 보고에서는 피부암의 절제 수술 부위 및 상처로 인해 손상된 피부 조직의 파괴 부위에 양막을 이용하여 치유할 경우 아무런 흉터 없이 정상적으로 회복되는 것을 확인한 보고가 있다(Am J Vet Res. 2000 Mar;61(3):326-9).

<14> 현재 안과적 모든 치료에 이용되고 있는 양막의 기능은 거의 밝혀진 것은 없으나 수술 후 생기는 각막 혼탁 등을 치료하는데 이용되고 있다.

<15> 각막은 밖으로부터의 자극에 대응하는 장벽으로서 중요한 역할을 하는 투명한 안구의 전방(anterior ocular)조직이다. 각막의 상처치유(wound healing)은 각막 세부구조(corneal sub-structure)의 분화와 조직화의 결과로서 나타나는 매우 복잡한 과정이다. 인체의 다른 부분과는 달리 각막 상처 치유는 많은 요소에 의해서 조절되어지는 여러 사건의 연속적인 과정이며, 인체의 여러 곳에서 상처 치유는 흉터 형성과 혈관형성(vascularisation)인데 반해 각막 상처 치유 과정의 가장 중요한 점은 최종 결과인 흉터 형성을 여러 요소들에 의한 연속적인 과정에 의해서 제거해야 하는 것이다.

<16> 양막은 1940년 De Rotth가 안과영역에서 결막의 검구유착과 결손시 양막을 적용한 이래 유착을 억제하고 상처부위를 보호하며, 상피의 apoptosis를 억제함으로써 상피화를 촉진시킬 뿐만 아니라, 정상 상피 형질을 보존하고, 염증과 신생혈관 생성을 감소시켜 반흔 생성을 줄여주는 효과가 있다고 보고 되었다(Retinal and Eye resrch, 1999 18(3) 311-356). 현재 Kim과 Tseng이 양막의 다양한 기능을 이용하여 여러 안 질환에 적용시키는 연구를 하여 최근 안과 외안부 분야에서 양막을 재발성 군날개 및 난치성 각막염, 각막궤양, 각막화학화상, 각막천공 및 Stevens-Johnson 증후군 등의 다양한 난치성 안구표면 질환 치료를 위하여 사용하고 있다.

<17> 그러나 양막에 의한 여러 효과나 기능에 대한 완전한 이해 등에 대한 연구는 아직 거의 밝혀진 것은 없다. 따라서 양막을 양막 제공자로부터 제공받아 사용하는 실정이며, 양막 제공자는 합병증이 없고, 혈청검사를 통해 감염증 (B형, C형간염, 매독, 사람면역부전바이러스)이 음성인 임신부만을 적용자로 하고 제왕 절개한 양막만 사용하며, 사용하는 기구는 모두 무균 처리 한 것만을 사용하고 있다. 그러나 처리 과정에서 세균 감염의 위험성이 존재하는 문제점이 있으며, 현재 양막 제공자의 양막을 냉동 보존하여 사용한 눈을 대상으로 양막을 세균학적으로 검토한 결과 10%에서 세균이 검출되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 결과는 양막을 사용함에 있어 더 많은 부작용을 유발할 수 있는 심각한 문제이며, 양막에서 흉터를 억제하는 물질만을 추출하여 사용할 시에는 이러한 감염의 발생을 예방할 수 있으므로, 양막에서 이러한 물질을 추출하여 적용할 필요가 있다.

<18> Bone Morphogenic Protein(BMP)-7은 골형성에 관여하는 물질로 알려져 있으며, 발생 시 치아와 안구의 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 성인의 경우에는 만

들어지지 않는 것으로 보고 되었다(Dev Biol. 1999 Mar 1;207(1):176-88., Exp Cell Res. 1997 Jan 10;230(1):28-37).

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<19> 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 양막으로부터 추출한 흉터형성 억제 물질 단백질을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<20> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생리적으로 유효량의 BMP-7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터형성 억제제를 제공한다.

<21> 본 발명에서 BMP-7은 수용액상에서 50ng/ml - 50ug/ml 인 것이 바람직하다.

<22> Dose로는 1회 투여시 0.1ng - 1ug씩 수회 사용하며 특히 1ng - 50ng 범위에서는 용량(dose) 의존적인 효능의 증가를 보이고, 독성이 없으며 이 범위 이하에서는 효과가 미비하고, 이 범위를 초과하면, 눈에 이물감 및 통증을 유발하므로 상기의 범위가 바람직하다.

<23> 또한 본 발명의 조성물은 망막, 간, 신장등 다양한 장기의 섬유화 억제제로 사용이 가능하며, 이러한 작용은 주로 TGF- β 등에 의한 smad 2 signal 억제를 통하여 나타나는 것이다.

<24> 이하 본 발명을 간단히 설명한다.

<25> 본 발명의 발명자들은 사람의 양막으로부터 단백질을 추출하고, 이를 막을 이용하여 크기 별로 분류하였다. 각 분획을 TGF- β 억제능을 확인하여 효과가 있는 분획을 2-D gel 전기 영동하여 여기서 얻은 점들을 MALDI TOF를 이용하여 분석하였다.

- <26> 가장 양이 많은 단백질을 분석한 결과 이것이 BMP-7임을 알게 되었으며, 이를 BMP-7 및 이에 대한 항체를 구입하여 확인 하였다
- <27> 이에 상품화되어 있는 BMP 7(R&D systems 354-BP)을 이용하여 사람의 피부유래 세포인 HaCat 세포 및 동물의 각막에 대해 실험하여 흉터 형성 억제제로의 사용가능성을 확인하였다.
- <28> 본 발명은 비한정적인 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- <29> 실시예 1: 양막에서 단백질의 추출
- <30> 제왕절개한 건강한 산모로부터 양막을 얻었다.
- <31> 양막 10g을 생리 식염수에 3회 세척 후 10 ml PBS와 함께 막자사발에 갈아내었다
- <32> 갈아서 얻은액을 원심분리하여 침전물을 제거했다. 여기서 얻은 추출액을 분자량 10만의 막(Amicon Inc.)을 통과시켰다 통과되지 않고 회수된 액은 PBS와 다시 섞어 막을 통과시키는 방법으로 추출액을 10만 이상과 이하로 구분하였다. 여기서 얻은 분자량 10만 이하의 추출액을 분자량 1만의 막을 이용하여 다시 1만 이하와 1만 이상으로 나누었다. (도 2)
- <33> 실시예 2: 양막추출액의 HacaT 세포 transformation 억제 효능 측정
- <34> HaCat 세포 배양
- <35> HaCat 세포 (Human skin keratinocyte)을 10% FBS가 포함된 MEM에서 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 배양하였다. 이 때 디쉬에 90% 이상 세포가 성장하면 10% FBS가 포함되지 않은 MEM 배지로 24 시간동안 시럼 결핍하였다.
- <36> 트랜스포메이션 및 억제능 측정

<37> 6 웰 plate에 세포가 2×10^5 되게 배양된 HaCat 세포에 TGF- β 1 (5 ng/ml) 과 대조군 및 분자량별 양막 추출액을 처리하였다. 처리 후 24 시간동안 마이오피브로브라스트 유도하였다 이 때 생성된 fibronectin의 양을 ELISA 법으로 측정하였다(표 1).

<38> 이 때 anti-fibronectin Ab (Accurate, IMS02-060-02)을 coating buffer (0.1 M carbonate buffer, pH9.6)에 10 μ g/ml 농도로 96-웰 플랫 바텀 플레이트에 부착시키고, 1% BSA blocking 한 후 fibronectin standard와 배양액을 처리하고, anti-fibronectin Ab, HRP (Accurate, IMS04-060-02)를 이용하여 발색 시켜 그 양을 측정하였다.

<39> [표 1] TGF- β 1 에 의한 마이오피브로브라스트 형성 양막 추출액의 분자량 별 억제능

	TGF 없음	TGF 만	TGF, 1만이하	TGF, 만 - 10만	TGF, 10만이상
흡광도	0.1	1.3	0.9	0.1	1.2

<41> 실시예 3: 양막 추출물의 2-D gel 전기영동 및 MALDI-TOF 분석

<42> 추출액의 단백질 분석

<43> 분자량 만 - 10만의 양막 추출물을 단백질 1mg/ml 되게 하여 0.5ml을 취한 후 에 TCA/Acetone을 1.5ml 가했다 그 후 원심분리하여 얻은 침전물을 acetone으로 세척 후 10% SDS와 2.5% DTE 수용액 10ul에 녹인 후 5분간 끓였다. 여기에 pH 3-10 IPG gel strip (amersham phaamasia biotech)을 이용하여 IEF(isoelectric focusing electrophorisis) 후 8-10% acrylamide gel에서 전기영동 후 Coomassie Blue G250을 이용하여 염색하였다. (도 3)

- <44> 염색한 gel의 주요 spot을 잘라내어 MALDI-TOF 및 Micromass Q-TOF MS를 이용한 ESI-TOF MS/MS로 단백질 서열 일부를 분석 의뢰하였다.(Australian Proteome Analysis Facility) 그 결과 spot이 BMP-7으로 밝혀졌다.
- <45> [표 2] 양막 추출물 internal sequence 분석
- <46> Sample EG265
- <47> *Matching protein;*
- <48> BMP-7 [Homo sapiens]
- <49> 1 hnsapmfmlldlynama
- <50> 2 fstqgpplaslqd
- <51> 실시예 4: 웨스턴 면역블롯팅을 이용한 BMP-7의 확인
- <52> 분자량 만 - 10만의 양막 추출물을 단백질 1mg/ml 되게 하여 0.5ml을 취한 후 에 TCA/Acetone을 1.5ml 가했다 그 후 원심분리하여 얻은 침전물을 acetone으로 세척 후 10% Acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 한 후 나이트로셀룰로오스 막에 트랜스퍼한 후 BMP-7 단일클론 항체를 이용하여 웨스턴 블롯한 결과 (도 1) 양막 추출물에 BMP-7이 있음을 확인 하였다.
- <53> 실험예: BMP-7의 효능시험
- <54> HaCat 세포 트랜스포메이션 억제
- <55> CHO 세포에서 발현시킨 재조합 BMP-7 (R&D system)을 구입하여 실시예 2와 같은 방법으로 HaCat 세포 트랜스퍼 억제능을 확인하였다 이 때 효능의 확인은 fibronectin의

항체를 이용한 웨스턴 블롯팅과(도 4) fibronectin 유전자 primer를 이용한 PCR (도 5) 두 가지 방법으로 확인하였다.

<56> 알칼리 화상을 입힌 Rat 각막의 회복시 흉터형성 억제 시험

<57> SD rat (male, 180-200 g, 대한)에 양쪽 눈 각막 중앙에 1.0 N NaOH에 적신 디스크를 60초간 처리 후 왼쪽 눈-배지, 오른쪽 눈-BMP 7 (320 ng/ml)을 50 μ l씩 안구에 점적하고 대조군에는 NaOH 처리 없이 배지 및 BMP-7을 처리하였다. 이 때 배지 및 BMP-7은 7일 동안 낮 시간 (오전 10:00 ~ 오후 7:00)에 3시간 간격, 4회 주입하였다. 이 후 2주 후에 사진 촬영하였다. (도 6)

<58> 사람의 혈액을 이용한 TNF- α 분비 억제 효과

<59> 20 U/ml Heparin 처리된 주사기를 이용하여 채혈한 사람혈액에 동량의 3% dextran을 넣은 후 실온에서 약 20분간 방치 후 상층액을 분리했다. 원심분리하여 얻은 침전물을 아이스 냉각된 0.2% NaCl 20 ml로 부유하고 다시 아이스 냉각된 1.6% NaCl 20 ml를 첨하여 얻은 PMN을 10% FBS가 포함된 RPMI1640에 1×10^6 세포/ml로 재부유하고 24 웰 플레이트에 웰 당 1ml씩 분주하고, 다시 웰 당 *E.coli* 0127:B8 LPS 100 ng/ml이 되도록 첨가 후 Saline 및 BMP 7을 농도별로 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 12시간동안 배양 한 후 웰 별로 상등액을 수집하여 ELISA 키트(Human TNF- α quatikine kit, R&D system)을 이용하여 분비된 사이토카인을 정량했다 (도 7)

【발명의 효과】

<60> 본 발명은 BMP-7이 기존에 알려진 뼈 형성 등의 효능 외에도 마이오피브로브라스트로의 transformation을 억제 함으로서 각막 및 피부에서 흉터가 형성되는 것을 억제 할

1020020069178

출력 일자: 2003/7/5

수 있다. 이를 이용하여 성형수술이나 각막의 레이저 수술 시 생길 수 있는 흉터의 억제
제로서 이용이 가능하다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

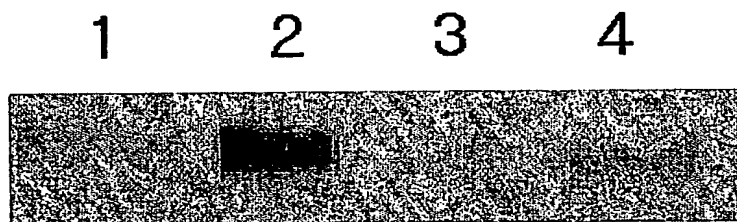
유효량의 서열정보1의 BMP-7 폴리펩타이드를 포함하는 흉터 형성 억제제

【청구항 2】

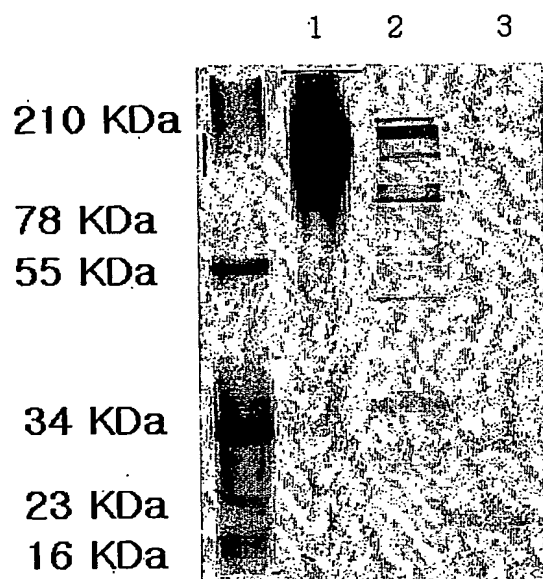
제1항에 있어서, 상기의 유효량은 50ng/ml - 50ug/ml 또는 0.1ng - 1ug/kg 체중인 것을 특징으로 하는 흉터 형성 억제제.

【도면】

【도 1】

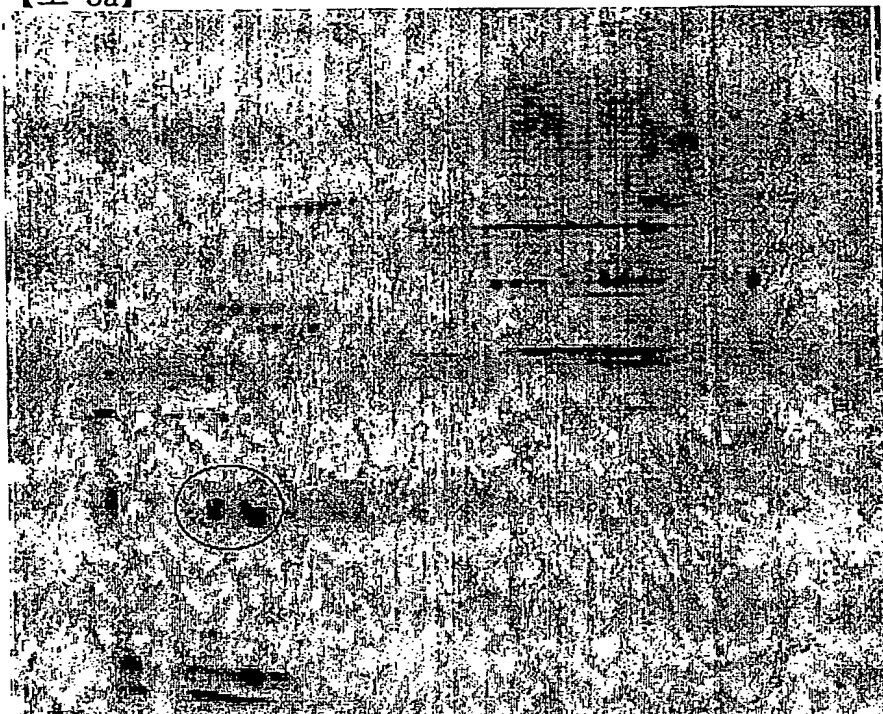


【도 2】

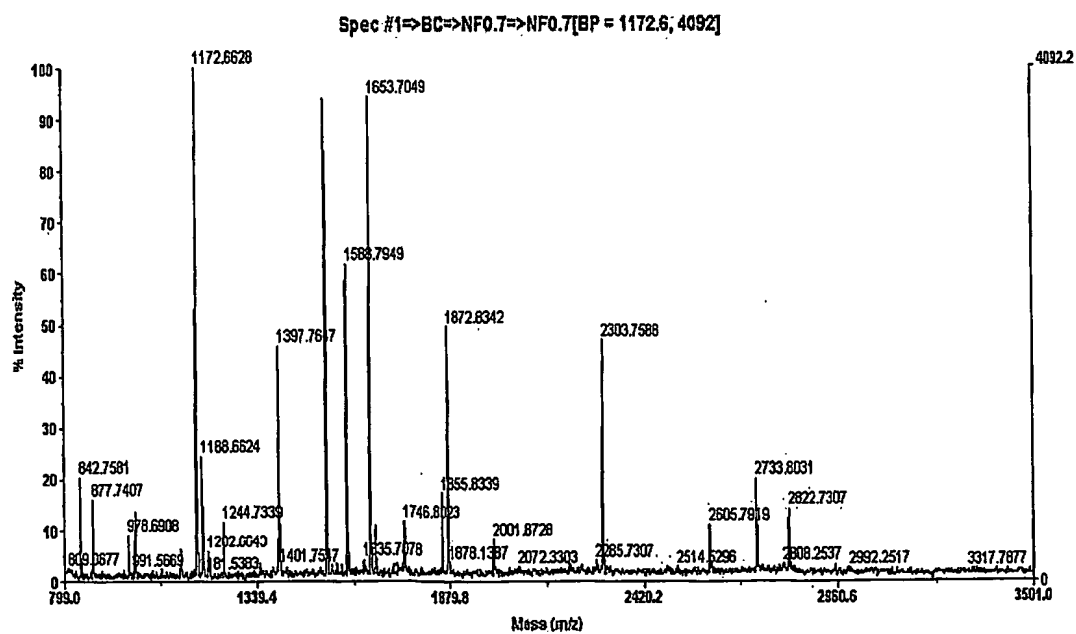


BEST AVAILABLE COPY

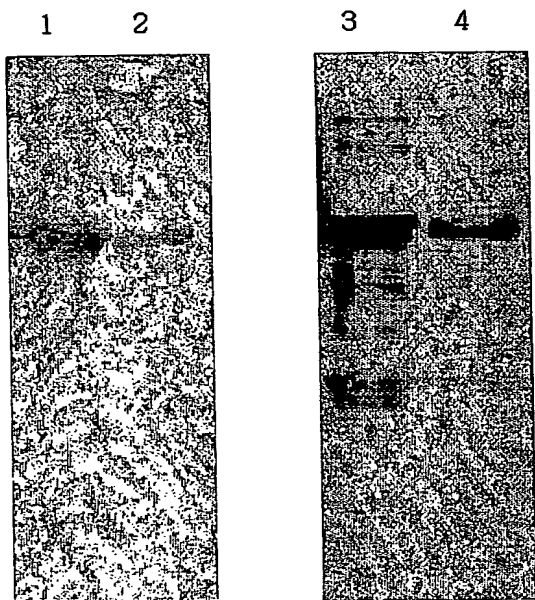
【도 3a】



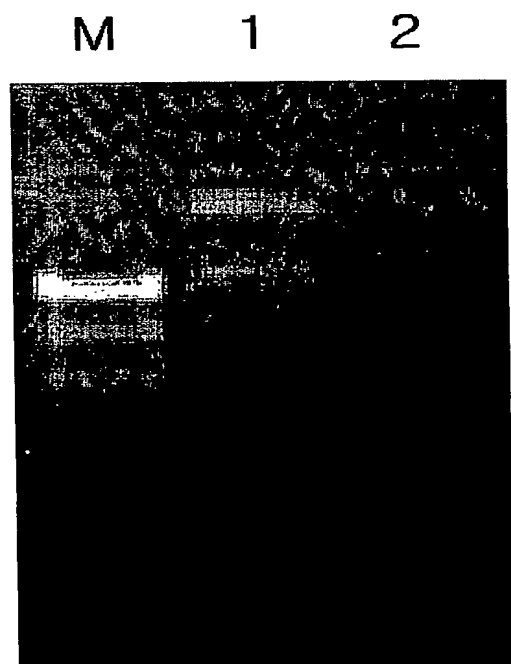
【도 3b】



【도 4】



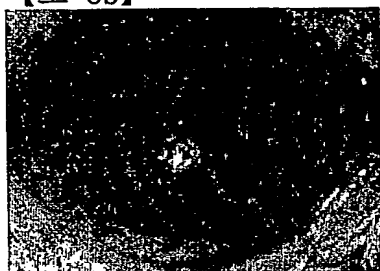
【도 5】



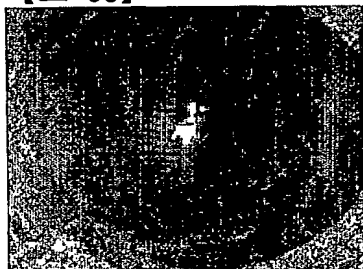
【도 6a】



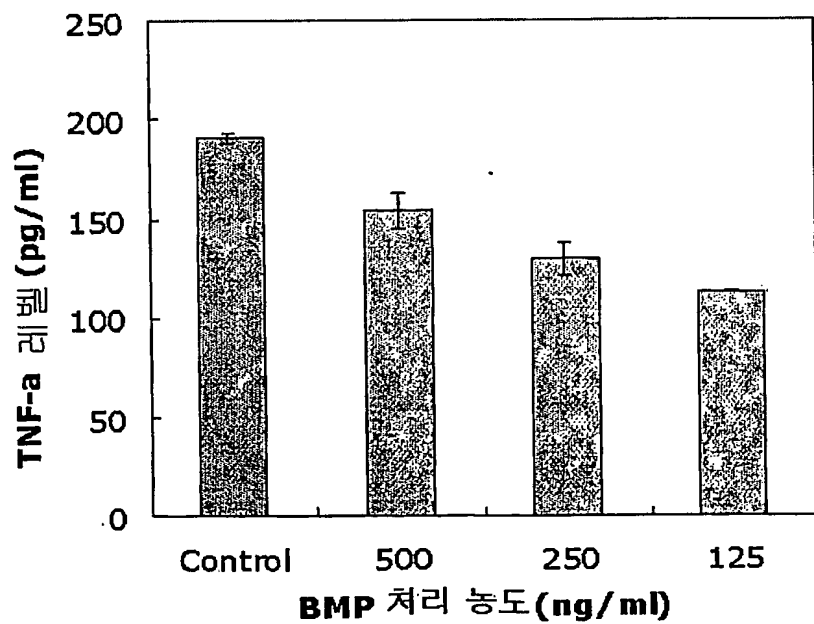
【도 6b】



【도 6c】



【도 7】



BEST AVAILABLE COPY

【서열목록】

<110> EYEGENE Inc.;YOO WON IL <120> Composition for preventing the
 formation of new scar comprising BMP-7 <160> 1 <170> KopatentIn
 1.71 <210> 1 <211> 139 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 1 Met
 His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala 1 5
 10 15 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp
 Phe Ser 20 25 30 Leu Asp Asn Glu
 Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser 35 40
 45 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu 50
 55 60 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser
 Ala Pro 65 70 75 80 Met Phe
 Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly 85
 90 95 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val
 Phe Ser 100 105 110 Thr Gln Gly Pro
 Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr 115 120
 125 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu 130 135